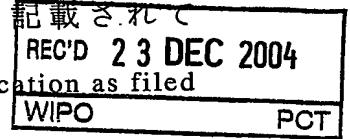


日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

29.10.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.



出願年月日 2004年 5月10日  
Date of Application:

出願番号 特願2004-139761  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP2004-139761]

出願人 柚 源一郎  
Applicant(s):

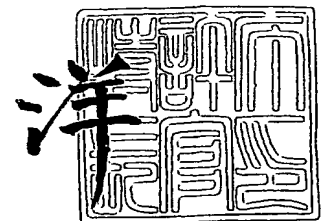
BEST AVAILABLE COPY

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004年12月13日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 P04-0017  
【提出日】 平成16年 5月10日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C08B 37/00  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都世田谷区東玉川 1-10-21  
    【氏名】 柚 源一郎  
【発明者】  
    【住所又は居所】 広島県広島市南区旭 1-4-41  
    【氏名】 河内 千恵  
【発明者】  
    【住所又は居所】 山口県下関市長府古江小路町 2-16  
    【氏名】 稲川 裕之  
【発明者】  
    【住所又は居所】 徳島県徳島市津田本町 3-3-38  
    【氏名】 西澤 孝志  
【特許出願人】  
    【識別番号】 390025210  
    【氏名又は名称】 柚 源一郎  
【代理人】  
    【識別番号】 100110191  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 中村 和男  
【先の出願に基づく優先権主張】  
    【出願番号】 特願2003-336555  
    【出願日】 平成15年 9月26日  
    【整理番号】 P03-0025  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 140410  
    【納付金額】 16,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

食用植物に由来する素材を専ら植物に共生する通性嫌気性グラム陰性菌によって発酵させて、同時に該通性嫌気性グラム陰性菌を培養することを特徴とする発酵及び培養方法。

**【請求項 2】**

炭素源として澱粉を前記通性嫌気性グラム陰性菌によって発酵させることを特徴とする請求項 1 記載の発酵及び培養方法。

**【請求項 3】**

前記通性嫌気性グラム陰性菌が通性嫌気性桿菌であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の発酵及び培養方法。

**【請求項 4】**

前記通性嫌気性桿菌が腸内細菌科に属するものであることを特徴とする請求項 3 記載の発酵及び培養方法。

**【請求項 5】**

前記通性嫌気性桿菌がパントエア属、セラチア属、又はエンテロバクター属に属するものであることを特徴とする請求項 3 記載の発酵及び培養方法。

**【請求項 6】**

前記通性嫌気性桿菌がパントエア・アグロメランスであることを特徴とする請求項 3 記載の発酵及び培養方法。

**【請求項 7】**

前記食用植物が穀物、海草、若しくは豆類、又はこれらの混合物であることを特徴とする請求項 1 乃至 6 いずれかに記載の発酵及び培養方法。

**【請求項 8】**

前記穀物に由来する素材が小麦粉、米粉、小麦ふすま粉、米ぬか、又は酒かすであることを特徴とする請求項 7 記載の発酵及び培養方法。

**【請求項 9】**

前記海草に由来する素材がわかめ粉、めかぶ粉、又は昆布粉であることを特徴とする請求項 7 記載の発酵及び培養方法。

**【請求項 10】**

前記豆類に由来する素材がおからであることを特徴とする請求項 7 記載の発酵及び培養方法。

**【請求項 11】**

請求項 1 乃至 10 いずれかに記載の発酵及び培養方法で得られることを特徴とする植物発酵エキス。

**【請求項 12】**

請求項 11 記載の植物発酵エキスから得られることを特徴とする植物発酵エキス末。

**【請求項 13】**

請求項 11 記載の植物発酵エキス又は請求項 12 記載の植物発酵エキス末が配合されていることを特徴とする植物発酵エキス配合物。

**【請求項 14】**

前記植物発酵エキス配合物が医薬品、動物用医薬品、医薬部外品、化粧品、機能性食品、飼料、又は浴用剤であることを特徴とする請求項 13 記載の植物発酵エキス配合物。

**【請求項 15】**

以下の理化学的性質を示す、請求項 11 記載の植物発酵エキス。

ポリミキシン B 存在下でもマクロファージ活性化能を示す。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】発酵及び培養方法、植物発酵エキスの製造方法、植物発酵エキス、植物発酵エキス末並びに該植物発酵エキス配合物

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ヒトを含む哺乳動物（具体的には家畜、愛玩動物など）、鳥類（具体的には養鶏、愛玩鳥類など）、両生類、は虫類、魚類（具体的には、水産養殖魚、愛玩魚類など）、無脊椎動物に及ぶ医薬品、動物用医薬品、医薬部外品、化粧品、機能性食品、飼料及び浴用剤などに添加しても安全な免疫賦活物質を得るための発酵及び培養方法、植物発酵エキスの製造方法、発酵及び培養方法によって得られる混合免疫賦活物質含有の植物発酵エキス、その植物発酵エキスから得られる混合免疫賦活物質含有粉末、及び、その植物発酵エキスを配合した植物発酵エキス配合物に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

ヒトを含む哺乳動物（具体的には家畜、愛玩動物など）、鳥類（具体的には養鶏、愛玩鳥類など）、両生類、は虫類、魚類（具体的には、水産養殖魚、愛玩魚類など）、無脊椎動物に関して、感染防除技術を含む疾病予防・治療法を確立することは喫緊の課題である。しかもこれを達成する上では、化学物質を用いず、環境汚染がなく、耐性菌を生ずることなく、人体に蓄積性がない方法が強く求められている。本発明者らは如上の課題に関して、すでに小麦水抽出物等の植物由来の免疫賦活物質が疾病予防・治療効果を安全に達成することを発見した（特許文献1、非特許文献1）。また、以上の目的を達成するために小麦共生細菌であるパントエア・アグロメランス（*Pantoea agglomerans*）から得た低分子量リボ多糖を用いることができる（非特許文献2）。一方、近年の研究により、リボ多糖以外の種々の物質が免疫賦活効果を示すことが明らかにされ、これら複数の免疫賦活物質を含む天然物素材が注目されている。

## 【0003】

ところで、微生物を用いた発酵技術は食品分野のみならず、広い分野で汎用されている。例えばワインをはじめとする酒類の製造、醤油や味噌の製造、チーズなど発酵乳製品の製造、医薬品の製造など極めて広い分野に及んでいる。これら発酵に用いられる微生物は広範に及んでおり、麹（真菌）酵母、乳酸菌などが代表的なものであるが、グラム陰性菌を用いるものは殆ど報告されてこなかった。一般に発酵とは有機物が微生物の作用によって分解的に作用する現象であり、広義には微生物による有用な物質の生産を意味する（非特許文献3）。これまでその生産物として免疫賦活物質が注目されたことはない。いわゆる免疫賦活物質生産を目的とした発酵及び培養法が注目されたことはない。一方、植物に共生している微生物を用いた発酵技術としては代表的なものとしてワインがあげられる。ワインはぶどう果皮に付着しているワイン酵母を用いた発酵技術であり、生産物はアルコールである。植物に共生している微生物を用いる発酵技術の中であって、グラム陰性菌を用いたものとしてはメタン発酵、酢酸発酵等が知られているが、免疫賦活物質やこの生産を可能にする発酵及び培養法に関しては報告されていなかった。

## 【0004】

【特許文献1】特開平3-218466号公報

【特許文献2】特開平8-198902号公報

【特許文献3】WO00/57719

【特許文献4】特開平6-78756号公報

【特許文献5】特開平4-187640号公報

【特許文献6】特開平4-49240号公報

【特許文献7】特開平4-99481号公報

【特許文献8】特開平5-155778号公報

【非特許文献1】稲川 裕之 外8名, "Biotherapy", 1991年, 第5巻, 4号, p617-62

1

【非特許文献2】Soma, G-I. 外1名, "Tumor Necrosis Factor: Molecular and Cellular Biology and Clinical Relevance", 1993年, p203-220

【非特許文献3】山田 常雄 外6名, "生物学事典 第3版", 1983年, p1021

【非特許文献4】Nishizawa, T. 外7名, "Chem. Pharm. Bull.", 1992年, 第40巻, 2号, p479-483

【非特許文献5】Inagawa, H. 外8名, "Chem. Pharm. Bull.", 1992年, 第40巻, 4号, p994-997

【非特許文献6】Neilson, A. H. "J. Appl. Bacteriol.", 1979年, 第46巻, 3号, p483-491

【非特許文献7】Nunes, C. 外3名, "Int. J. Food Microbiol.", 2001年, 第70巻, 1,2合併号, p53-61

【非特許文献8】山田 常雄 外6名, "生物学事典 第3版", 1983年, p287-288

【非特許文献9】Nunes, C. 外4名, "J. Appl. Microbiol.", 2002年, 第92巻, 2号, p247-255

【非特許文献10】Asis, C. A. Jr. 外1名, "Lett. Appl. Microbiol." 2004年, 第38巻, 1号, p19-23

【非特許文献11】Vanneste, J. L. 外3名, "J. Bacteriol." 1992年, 第174巻, 9号, p2785-2796

【非特許文献12】Kearns, L. P. 外1名, "Appl Environ Microbiol." 1998年, 第64巻, 5号, p1837-1844

【非特許文献13】オー・ウエストファール (O. Westphal) 編, 「メソッズ・イン・カーボハイドレート・ケミストリー (Methods in Carbohydrate Chemistry)」, アカデミック・プレス (Academic Press), 1965年, 第5巻, p83

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0005】

既述したように、免疫賦活物質は植物自身が含有する場合と植物に共生する微生物の構成成分又は生産物である場合が多い。従って、摂取しても安全な天然物由来の免疫賦活物質を得ようとするれば、食用植物自身から成分を抽出するか（例えばリムラス陽性糖脂質、特許文献1）食用植物に共生する微生物を効率よく培養してその構成成分又は生産物を取得すること（例えば低分子量リポ多糖、特許文献2）が有用である。しかし、食用植物に含まれる免疫賦活物質の含量は少なく、この摂取により免疫賦活効果を期待するためには極めて多量の食品を取らなければならず、更に単に植物成分や共生する微生物の構成成分又は生産物を摂取しても免疫賦活物質の摂取量を適正に保つことが一般的には容易でないために、コスト的あるいは効果を期待する両面から実用性に乏しい。従って、食用植物に由来する素材を専ら植物に共生する通性嫌気性グラム陰性菌によって発酵させて、同時に該通性嫌気性グラム陰性菌を培養することによって植物成分を発酵させるとともに、微生物の生産物を含むエキスが得られれば食用植物あるいは食用植物に共生する微生物のどちらか一方から得られる免疫賦活物質単独ではなく、これら両者を含み、両者の相乗的免疫賦活効果を示す植物発酵エキスを製造することが可能であるとともに、得られた植物発酵エキスは安全な天然物由来の免疫賦活素材として医薬品、動物用医薬品、医薬部外品、化粧品、機能性食品、飼料及び浴用剤などの広い用途に活用できると考えられる。

#### 【0006】

一方植物に共生する微生物に注目すると例えば、小麦共生細菌であるバントエア・アグロメランスは免疫賦活に有効な低分子量リポ多糖を構成成分として含んでおり、この菌は食用植物に由来する素材に作用させ発酵及び培養することにより免疫賦活物質を得る上で極めて有用である。ところで、低分子量リポ多糖を抽出するには、これまでは培養液に含まれるタンパク質の主成分が動物由来のもの、例えばNZアミンやトリプトンやカザミノ酸など高価な培養液を用いてバントエア・アグロメランスを培養する必要があった。さら

に、免疫賦活物質は単一成分ではなく複数の成分が含まれるものが得られれば、より汎用性の高い多くの用途が開発されることになりうる。しかもこれら汎用性の高い免疫賦活物質はできるだけ安価に供給されなければならない。一つの方法として培養に用いる主たるタンパク質の主成分に安価な植物由来の物質を用いることが考えられる。然しながら、これまでパントエア・アグロメランスの培養に培養液に含まれるタンパク質の主成分を植物由来のものにした培地で培養すること、例えば小麦粉やおからを用いて培養することは全く試みられておらず、着想もされていなかった。

#### 【0007】

本発明は、上記問題点に鑑み、植物の持つ免疫賦活作用という有用性を効果的に利用するために、これまでにない効果的な免疫賦活エキスを、植物発酵エキス又は植物発酵エキス末として提供すること、更にこの植物発酵エキスを多方面の用途に対応することが可能なように、安全、安価に製造する発酵及び培養方法、さらにはエキス、エキス末、該エキスを配合した医薬品、動物用医薬品、医薬部外品、化粧品、機能性食品、飼料及び浴用剤を提供することを目的とする。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

本発明の発酵及び培養方法は、食用植物に由来する素材を専ら植物に共生する通性嫌気性グラム陰性菌によって発酵させて、同時に該通性嫌気性グラム陰性菌を培養することを特徴とする。

また、炭素源として澱粉を前記通性嫌気性グラム陰性菌によって発酵させることで、単純な過程で発酵及び培養をすることができる。

前記通性嫌気性グラム陰性菌は、通性嫌気性桿菌であることが望ましい。

前記通性嫌気性桿菌は、腸内細菌科に属するものであることが望ましい。

また、前記通性嫌気性桿菌は、パントエア属、セラチア属、又はエンテロバクター属に属するものであることが望ましい。

また、前記通性嫌気性桿菌は、パントエア・アグロメランスであることで、澱粉を炭素源とすることができる。

また、前記食用植物は、穀物、海草、豆類、又はこれらの混合物であることが望ましい。

また、前記穀物に由来する素材は、小麦粉、米粉、小麦ふすま粉、米ぬか、又は酒かすであることが望ましい。とくに小麦粉はタンパク質源としてグルテンを含むので、動物由来の素材を用いなくても効率良く発酵及び培養をすることができる。また、前記海草に由来する素材は、わかめ粉、めかぶ粉、又は昆布粉であることが望ましい。

また、前記豆類に由来する素材は、おからであることで、タンパク質を多量に含むため動物由来の素材を用いなくても効率良く発酵及び培養をすることができる。

また、本発明の植物発酵エキスは、前記発酵及び培養方法によって得られることを特徴とする。

また、本発明の植物発酵エキス末は、前記植物発酵エキスから得られることを特徴とする。

また、本発明の植物発酵エキス配合物は、前記植物発酵エキス又は植物発酵エキス末が配合されていることを特徴とする。

また、前記植物発酵エキス配合物は、医薬品、動物用医薬品、医薬部外品、化粧品、機能性食品、飼料、又は浴用剤であってもよい。

また、前記植物発酵エキスは、以下の理化学的性質を示すことが望ましい。

ポリミキシンB存在下でもマクロファージ活性化能を示す。

#### 【発明の効果】

#### 【0009】

本発明によれば、動物由来の成分を含まない培地で培養することができるので、動物成分由来の不純物の混入の問題がないので安全性が高く、安価に多方面の用途に対応するこ

とが可能な植物発酵エキスの製造方法が提供され、安全、安価に免疫賦活物質含有植物発酵エキス又は植物発酵エキス末が製造でき、さらに該培養液、免疫賦活物質及びエキス及びエキス末さらに該エキス又はエキス末を配合した医薬部外品、化粧品、機能性食品、飼料及び浴用剤を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

以下、本発明の好適な実施の形態について詳細に説明する。

I：パントエア・アグロメランズを用いた植物発酵エキスの製造方法

我々は小麦粉の水抽出物には免疫を賦活化する有効な成分が含まれていることをこれまでに明らかにしてきた（非特許文献4）。また、穀物（小麦、米）、海藻（わかめ、昆布、ひじき、のり等）、豆類（大豆、小豆）にも有効な成分が含まれていることを明らかにしてきた（非特許文献5）。この生物活性としては、ヒトやマウスの諸疾患（糖尿病、高脂質血症、アトピー性皮膚炎、がん）等の予防効果があること、魚類や甲殻類、トリの感染予防に有効であることを見いだしている（特許文献1、非特許文献1）。しかし、小麦粉水抽出物で、上述の効果を期待するためには多量の小麦粉の摂取が必要になる。一方、パントエア・アグロメランズは小麦に共生する細菌であり、小麦にリン、窒素の供給を行うことから小麦栽培に有用な菌であると考えられる（非特許文献6）。また、パントエア・アグロメランズは小麦のみならず、梨やリンゴの果実の表皮に付着しており、この菌が付着しているとカビによる腐れ病が予防できることがヨーロッパにおいて明らかにされ、本菌を無毒で、自然環境に優しい防かび剤として利用する開発が進んでいる（非特許文献7）。なお、共生とは、「異種の生物が一緒に生活している現象。この場合、互いに行動的あるいは生理的に緊密な結びつきを定常的に保っていることを意味するのが普通である。従って、同じ生息場所に住んでいるだけでは、この概念には入らない。共生者にとっての生活上の意味・必須性、関係の持続性、共生者の空間的な位置関係などによって、共生はいろいろに類別・区別されている。ふつうには、共生者の生活上の利益・不利益の有無に基準を置いて、共生を相利共生、片利共生、寄生の三つに大きく区分する。」と定義されている（非特許文献8）。

【0011】

パントエア・アグロメランズの場合、小麦からはその産地、種類を問わず分離されている（非特許文献4）こと、また果実からも分離されること（非特許文献9、10）がわかっている。パントエア・アグロメランズは、抗生物質を産生し（非特許文献11、12）カビや他の細菌から植物を保護すること、リン、窒素固定を行うこと（非特許文献6）が報告されている。従って、パントエア・アグロメランズは植物に常在し、植物に益する役割を担うと考えられ、「寄生」ではなく「共生」と捉えられる。

【0012】

さらに、我々はパントエア・アグロメランズには免疫を賦活化する有効な成分が含まれていることをこれまでに明らかにしてきた。また、この菌から得た低分子量リポ多糖はヒトやマウスの諸疾患（糖尿病、高脂質血症、アトピー性皮膚炎、がん）等の予防効果があること、魚類や甲殻類、トリの感染予防に有効であることを見いだしている（特許文献3、非特許文献2）。

【0013】

この様な状況で我々は、安全に、かつ安価な免疫賦活物質を製造する方法として、パントエア・アグロメランズを用いた植物発酵エキスの製造方法を確立することを着想した。そこで、(1).培養液に含まれるタンパク質の主成分を植物由来のものにした培地を用いてパントエア・アグロメランズを低コストで培養するとともに植物成分を発酵させ、(2).小麦に含まれるパントエア・アグロメランズ或いは発酵による生産物を多く含む素材を調製し、これを用いることでヒトを含む哺乳動物（具体的には家畜、愛玩動物など）、鳥類（具体的には養鶏、愛玩鳥類など）、両生類、は虫類、魚類（具体的には、水産養殖魚、愛

玩魚類など)、無脊椎動物に及ぶ医薬品、動物用医薬品、医薬部外品、化粧品、機能性食品、飼料及び浴用剤を開発すること、に着目した。すなわち、例えばパントエア・アグロメランスを用い、小麦粉を主成分として含む培地で発酵及び培養させ、免疫賦活物質を多く含む植物発酵エキス(以下、パントエア・アグロメランスを用い、小麦粉を主成分として含む培地で発酵及び培養させて得た植物発酵エキスを小麦発酵エキスと呼ぶ。)を低コストで製造できれば、具体的な例としてヒト、畜産・水産養殖の分野で環境に優しく、安全で感染予防に有効な医薬部外品、化粧品、機能性食品、飼料を提供できる。上記の植物発酵エキスとは発酵及び培養を行って得られる培養液そのものや、これを固液分離して得られる液体成分、また固体成分に抽出過程を加え得られる液体成分などを総称する名称である。すなわち、植物発酵エキスは本発明に係る発酵及び培養方法によって得られる培養液そのもの、及び、その培養液の全部又は一部分を用いて調製することのできるエキスをすべて含んでいる。

#### 【0014】

そして、本件において、パントエア・アグロメランスを用いた発酵及び培養生産物としての免疫賦活物質を多く含む小麦発酵エキスを安価に製造する方法を発明した。通常、培養液には牛乳由来のカゼイン等のタンパク質を消化酵素で分解した産物を添加する。この場合には培地 1 lあたりの原価は約 250 円となるが、これが小麦粉で代替出来れば原価は約 16 円となる。また、植物に含まれている糖質は澱粉の形態で保存されることが多く、これは主として穀類で顕著である。多くの微生物は澱粉を分解して栄養源とすることは出来ず、栄養源とするためにはアミラーゼなどの作用によって、澱粉を分解し分子量の小さいオリゴ糖にすることが必要である。従って、このようにして調製した培養液は極めて高価になる。一方、我々はパントエア・アグロメランスの場合は、澱粉を直接炭素源として生育可能であることを見出した。言うまでもないが植物発酵エキスは乾燥して植物発酵エキス末として利用することもできるし、植物発酵エキス末を任意の濃度に適当な溶液例えば生理食塩水入りの燐酸緩衝液などに溶解して利用することもできる。

#### 【0015】

本実施の形態では小麦発酵エキスが示す免疫賦活作用の指標として、マクロファージ活性化作用を TNF 産生能で評価した。

#### 【0016】

また、パントエア・アグロメランスを用いた発酵及び培養により、免疫賦活する有効成分の一つとしてパントエア・アグロメランス由来の低分子量リポ多糖の含有も期待される。そこで、低分子量リポ多糖含量を測定した。低分子量リポ多糖については特許文献 2 に詳述されている。なお、本実施例は小麦発酵エキスに関するものであるが、植物が小麦、免疫賦活物質が低分子量リポ多糖に限定されることを意味する訳ではない。

#### 【0017】

低分子量リポ多糖は、汎用されている高分子量型のリポ多糖(以下通常のリポ多糖)に比べて極めて安全性が高く、かつ生物活性も通常のリポ多糖に比して優れている。

#### 【0018】

##### 1: パントエア・アグロメランスの分離

小麦粉を水に懸濁し、上澄み液を LB 寒天培地に塗り広げ培養を行うと、微生物のコロニーが出現する。これらのコロニーを定法により微生物の同定を行う。例えば、グラム染色陰性、グルコース嫌氣的代謝反応陽性、オキシダーゼ活性陰性のコロニーを選択し、さらに、ID テスト・EB-20(日水製薬)等を用いて、スタンダードのパントエア・アグロメランスと同じ性質を有するものを選択する。スタンダードとなるパントエア・アグロメランスは理化学研究所生物基盤研究部微生物系統保存施設より入手可能である(非特許文献 4)。以下の説明において、百分率の表示は、特に断りのない限り、重量による値である。

#### 【0019】



## 2: 低分子量リボ多糖の製造方法

この低分子量リボ多糖は、グラム陰性の微生物、例えば、パントエア属に属する微生物又はサルモネラ属に属する微生物等を、常法により培養し、細菌培養用の培地から菌体を集め、集めた菌体から公知の方法、例えば、熱フェノール法（非特許文献13）、により抽出し、さらに、陰イオン交換樹脂により精製して製造できる。

### 【0020】

このようにして得られた精製リボ多糖は特許文献2～8に開示される分子量5,000から6,000程度のリボ多糖と実質的に等しい。ところで培養法は上述の場合公知の方法であり、培養液に含まれるタンパク質の主成分が動物由来のものであり、培地のコストが高い。さらに、動物に例えば機能性食品や機能性飼料を与え、或いは経皮的に用いる場合に、BSEに代表されるように動物由来の不純物の混入が食の安全性の点から問題になること、更に製造コストが高額となり実用性の面から見ると十分な方法ではない。

### 【0021】

そこで本発明者らは、安全で、安価な免疫賦活作用を持つ天然物を得るために鋭意研究を進めた結果、小麦発酵エキスを得るためにパントエア・アグロメランズを用いる発酵及び培養方法を確立して本発明を完成したものである。培養液に含まれるタンパク質の主成分は、従来は動物由来のものであったが、本発明はこれを植物由来のものにした。以下に実施例として発明内容を詳述するが、本発明は実施例記載の微生物としてパントエア・アグロメランズ、食用植物として小麦あるいは素材として小麦粉に限定されたものではなく、免疫賦活物質を多量に含む他の食用植物から通常の工程を経て得られる素材、例えばわかめにも適応できるし、穀物（穀物に由来する素材である小麦粉、米粉、小麦ふすま粉、米ぬか、又は酒かす等を含む）、海藻（海藻に由来する素材であるわかめ粉、めかぶ粉、又は昆布粉等を含む）、豆類（豆類に由来する素材であるおから等を含む）にも適応できる。これらの植物にはタンパク質、糖類が含まれていることはよく知られており、パントエア・アグロメランズを用いる発酵及び培養に適応できる。また、これらの植物に常在性の細菌、例えばセラチア属、エンテロバクター属が共生していることは広く知られたところであり（非特許文献4）、発酵に用いる微生物もそれら植物に共生する通性嫌気性グラム陰性菌にも適応できるものであることは言うまでもない。

### 【0022】

#### II: 発明の重要な点のまとめ

- (1). 小麦発酵エキスそのものが新規。
- (2). グラム陰性菌のパントエア・アグロメランズを用いて植物発酵エキスを製造することが新しい。

### 【0023】

#### III: 小麦発酵エキスの具体的製造方法

1. パントエア・アグロメランズは小麦粉より定法に従い単離する（非特許文献1）。なお、一度、単離同定すれば、この菌を50%グリセロール等で保存が可能である。
2. 0.05～5%の食塩、0.005～1モルのリン酸緩衝液、または、混合塩類溶液（0.5～10%のリン酸第二ナトリウム、0.05～5%のリン酸第一カリウム、0.05から5%の塩化ナトリウム、0.05～5%の塩化アンモニウム）等を調製する。
3. 0.05～10%の濃度になるように小麦粉を水に懸濁する。
4. 0.2～3モルの塩化マグネシウム溶液を調製する。
5. 0.2～3モルの塩化カルシウム溶液を調製する。
6. 2から5の場合によってはオートクレーブ等で滅菌操作を行う。
7. 2から5を適量混合し、水を加え、0.1～5%の小麦粉を含む懸濁液とする。場合によってはアルカリ溶液や酸性溶液を加えpHを中性にする。
8. 7の場合によっては培地1リットルあたり10～50000単位アミラーゼを加えて10℃から80℃で1～24時間保温して、小麦でんぷんを部分消化させるのもよい。

9. 7乃至8に1で単離したパントエア・アグロメランスを添加する。
10. 9を1〜40℃で発酵させる。場合によっては静置や震盪してもよい。また、数時間おきに攪拌を行うこともよい。
11. 10を6時間から一週間発酵させる。発酵が進むと小麦粉水溶液が黄色に着色してくる。
12. 11の発酵途中に適宜アルカリ溶液を加え、pHを中性にすることや、小麦粉懸濁液や無機塩類を添加することもよい。
13. 発酵を終了させ、遠心分離（1000〜5000rpm、10〜60分間）等の操作により固形分を沈殿物として回収する。沈殿物は小麦粉発酵物として、そのまま飼料として又は飼料に混ぜる原料として使うこともできる。
14. 小麦発酵エキスを製造する場合は、13を水または塩類緩衝液等で懸濁し、これを80〜140℃で10分から6時間加熱処理する。さらに、これを遠心分離や濾過することで、固形分を除去してもよい。除去した沈殿に再度水や緩衝液を加え、加熱抽出を数回繰り返してもよい。
15. 14で製造した小麦発酵エキスは用途によってはさらに簡便な精製を追加することが出来る。すなわち、14のエキスを塩化ナトリウム等の塩を最終濃度0.05〜1mol/lに調整し、エタノール等の溶媒をエキスの1〜3倍量添加すると沈殿が生じる。これを遠心分離機等で回収してもよい。この沈殿をさらに、エタノール等の溶媒で洗浄してもよい。これを乾燥させれば、粉末とすることも出来る。

#### 【実施例1】

##### 【0024】

1. 小麦粉0.5gに蒸留水5mlを加え懸濁し、上澄みをLBプロス寒天培地に0.1ml添加し、37℃で一晩培養した。
2. 黄色のコロニーを単離し、通常の方法で菌を同定し、パントエア・アグロメランスを単離し、これを50%グリセロール溶液に懸濁し、冷凍庫に保存した。このストックの一部をLB寒天培地にとり、37℃に放置してパントエア・アグロメランスの独立コロニーを作成した。
3. 2リットルの三角フラスコにリン酸第二ナトリウム・7結晶水64g、リン酸第一カリウム15g、塩化ナトリウム2.5g、塩化アンモニウム5gをとり、精製水を加え全量1リットルとした。塩化マグネシウム・2結晶水13.1gをとり、精製水を加え全量を100mlとした。塩化カルシウム11.1gをとり、精製水を加え全量を100mlとした。4リットルの精製水を5リットルの三角フラスコにいった。上記の溶液、精製水はすべてオートクレーブ（TOMY BS-325、120℃、20分）して滅菌処理を行った。
4. 1リットルの三角フラスコに小麦粉（日清製粉）24gをとり、精製水を加え全量600mlとした。これを同様にオートクレーブした後、 $\alpha$ -アミラーゼ（SIGMA、Bacillus、タンパク質1mg当たり1500〜3000単位の酵素活性）3mgを加え、65℃の水浴で4〜12時間加熱した。
5. 3で調整した溶液等をそれぞれ表1に示した量を無菌的に滅菌した3リットルの坂口フラスコに入れ小麦粉培地とした。

##### 【0025】

【表 1】

表 1

材料	用量
無機塩類混合溶液	200ml
精製水	550ml
小麦粉アミラーゼ処理液	200ml
塩化マグネシウム溶液	2.0ml
塩化カルシウム溶液	0.1ml

## 【0026】

6. 種菌の調製。前もって同じ組成で調製しておいた5の小麦粉培地10mlに、2で小麦粉より単離しておいたパントエア・アグロメランスのコロニーを一つ加え37℃で一晩(12～15時間)緩やかに攪拌し、発酵させて、小麦粉発酵用の種菌を準備した。

7. 5に6を全量加え37℃で攪拌しながら、20～30時間発酵させた。発酵液のpHを測定し、アンモニア水を加え、pHを7に調整した。これに、150mlの小麦粉アミラーゼ処理液と無機塩類混合溶液37.5mlを無菌的に添加し、同様に発酵を20～30時間行った。同じ操作をさらに、もう一度繰り返し、合計で65から80時間発酵させた。

8. 7の小麦粉発酵溶液を遠心分離(日立、高速冷却遠心機 SCR-20B、5000rpm、20分間、4℃)し、沈殿を回収した。

9. 8の沈殿にリン酸緩衝液を加えて懸濁し、全量100mlとして、33mlずつ50ml遠心管に移し、沸騰水浴中で30分間加熱抽出した。加熱終了後、室温まで冷却し、本液を遠心分離(日立、高速冷却遠心機 SCR-20B、10000rpm、20分間、20℃)した。遠心後、淡黄色の上清82mlをデカントで別の容器に回収した。

10. 9の上清80mlに8.9mlの5モル塩化ナトリウム溶液を加えた。これに178mlのエタノールを加えると白濁を生じた。これを、冷凍庫(-90℃)で一晩放置後、本液を遠心分離(日立、高速冷却遠心機 SCR-20B、10000rpm、20分間、4℃)した。上清を除き沈殿を得た。沈殿に冷やした10mlの70%エタノールを加え、懸濁した後、本液を遠心分離(日立、高速冷却遠心機 SCR-20B、10000rpm、20分間、20℃)し、沈殿を洗浄した。沈殿を風乾し、蒸留水に溶解し、11mlの小麦発酵エキス溶液を得た。

11. 乾燥重量の測定 0.3mlを予め秤量した1.5mlプラスチックチューブに移し、凍結後、凍結乾燥機にて、凍結乾燥を行ったところ7.45mgで衡量となった。したがって、10の小麦発酵エキスの乾燥重量は溶液1ml当たり24.8mg、全量11ml当たり、273mgであった。

12. 同一の方法で独立に8回の小麦発酵エキスを製造し、それぞれをブラッドフォード法によるタンパク質定量BSAを標準タンパク質として、各サンプルのタンパク質量を測定した。比較対象として精製したリムラス陽性糖脂質(特許文献1)と低分子リポ多糖(特許文献2)を用いた。測定結果を表2に示した。表2～5、7の小麦発酵エキスについての数値は上記10で得られる小麦発酵エキスを乾燥して得られた重量の1gあたりの含有量をmgで表示した。

13. 糖含量の測定 フェノール硫酸法によりグルコースを標準糖として測定した。測定結果を表3に示した。

14. 核酸含有量の測定 100倍希釈したサンプルの210～340nmの吸光度測定を行った。260nmの吸光度から320nmの吸光度を引いた値と、DNAとしての吸光度1ODあたり、50μgとしての最大含有量を算出した。測定結果を表4に示した。

15. リムラスアッセイによるリムラス活性物質含有量の測定 リムラス活性物質量は生化学工業のトキシカラーシステムを用い、標準リムラス活性物質として、生化学工業Et-1を用いた。測定結果を表5に示した。

16. ヨウ素でんぷん反応 ヨウ素試薬1N (ヨウ素12.7gにヨウ化カリウム25gに水10mlを加え、よく混ぜた後、水を加えて100mlとしたもの)を用時、水で200倍希釈し、これを、予め1mg/mlの濃度に溶解させた小麦発酵エキス0.1mlに5 $\mu$ l加えて良く混ぜる。小麦発酵エキスは直ちに溶液は淡紫色から濃紫色の発色を示した(陽性)。リムラス陽性糖脂質、低分子量リボ多糖は同様な操作で発色は認められない(陰性)。以上の結果を表6にまとめた。

17. 上記結果から明らかなように、小麦発酵エキスはリムラス陽性糖脂質、低分子量リボ多糖とはタンパク質含量、糖含量、核酸含量(リムラス陽性糖脂質はデータが無いので除く)、リムラス活性物質含量、ヨウ素でんぷん反応のすべての項目で異なることが明白であり、本物質が新規であることが明らかである。以上の結果を簡単に表7にまとめた。すなわち、本発明の植物発酵エキスは以下のそれぞれの理化学的性質を示す点で、リムラス陽性糖脂質及び低分子量リボ多糖とは異なり新規なものである。

タンパク質含量5~15%、糖含量20~45%、核酸含量10~35%、及びリムラス陽性物質含量10~40%を含み、ヨウ素でんぷん反応に陽性であり、ポリミキシンB存在下でもマクロファージ活性化能を示す。

【0027】

【表2】

表2 発酵エキス中のタンパク質含量

サンプル	タンパク質含量 (mg/g)
小麦発酵エキス1	60
小麦発酵エキス2	71
小麦発酵エキス3	90
小麦発酵エキス4	105
小麦発酵エキス5	103
小麦発酵エキス6	82
小麦発酵エキス7	88
小麦発酵エキス8	88
リムラス陽性糖脂質	40
低分子量リボ多糖	3.8以下

【0028】

【表3】

表3 発酵エキス中の糖含量

サンプル	糖含量 (mg/g)
小麦発酵エキス1	318
小麦発酵エキス2	428
小麦発酵エキス3	313
小麦発酵エキス4	232
小麦発酵エキス5	372
小麦発酵エキス6	324
小麦発酵エキス7	298
小麦発酵エキス8	329
リムラス陽性糖脂質	133
低分子量リボ多糖	668

【0029】

【表 4】

表 4 発酵エキス中の核酸含量

サンプル	核酸含量 (mg/g)
小麦発酵エキス 1	102
小麦発酵エキス 2	102
小麦発酵エキス 3	226
小麦発酵エキス 4	291
小麦発酵エキス 5	302
小麦発酵エキス 6	240
小麦発酵エキス 7	218
小麦発酵エキス 8	216
リムラス陽性糖脂質	未報告
低分子量リポ多糖	2.8

【0030】

【表 5】

表 5 発酵エキス中のリムラス活性物質含量

サンプル	リムラス活性物質含量 (mg/g)
小麦発酵エキス 1	242
小麦発酵エキス 2	118
小麦発酵エキス 3	125
小麦発酵エキス 4	458
小麦発酵エキス 5	224
小麦発酵エキス 6	231
小麦発酵エキス 7	356
小麦発酵エキス 8	289
リムラス陽性糖脂質	970
低分子量リポ多糖	993

【0031】

【表 6】

表 6 発酵エキスのヨウ素でんぷん反応

サンプル	判定
小麦発酵エキス 1	陽性
小麦発酵エキス 2	陽性
小麦発酵エキス 3	陽性
小麦発酵エキス 4	陽性
小麦発酵エキス 5	陽性
小麦発酵エキス 6	陽性
小麦発酵エキス 7	陽性
小麦発酵エキス 8	陽性
リムラス陽性糖脂質	陰性
低分子量リポ多糖	陰性

【0032】

【表 7】

表 7 小麦発酵エキス及び類似品との相違のまとめ

サンプル	タンパク 質含量	糖含量	核酸含量	リムラス活 性物質含量	ヨウ素でん ぷん反応
小麦発酵エキス (平均±標準偏差)	86±1 5mg/g	327±5 7mg/g	212±7 5mg/g	255±1 13mg/g	陽性
リムラス陽性糖脂質	過小	過小	未測定	過多	陰性
低分子量リポ多糖	過小	過多	過小	過多	陰性

過小：小麦発酵エキスの数値の幅（平均±標準偏差）よりも大幅に少ない値。過多：小麦発酵エキスの数値の幅（平均±標準偏差）よりも大幅に多い値

## 【実施例 2】

## 【0033】

小麦発酵エキスの免疫賦活作用

48穴プレートにヒト急性骨髄性白血病細胞株のTHP-1（ $1 \times 10^6$  個/ $250 \mu\text{l}$ ：10%ウシ胎児血清入りRPMI1640培地）を入れ、予め30分間前培養した。各サンプルの終濃度が1～10000 ng/mlになるように培地 $250 \mu\text{l}$ （最終量 $500 \mu\text{l}$ ）を加えた。サンプルにポリミキシンB（12.5  $\mu\text{g/ml}$ ）を含む群を設けた。4時間培養した後、培養上清と細胞を回収した。上清のTNF活性は、L-929細胞障害試験により測定した。結果を表8に示す。小麦発酵エキスはポリミキシンB存在下でもTNF活性を誘導したが、低分子量リポ多糖及びリムラス陽性糖脂質はポリミキシンB存在下でTNF活性の誘導は認められなかった。このことから小麦発酵エキスは低分子量リポ多糖やリムラス陽性糖脂質とは異なる生物活性を持つ事が明らかである。

## 【0034】

## 【表 8】

表 8 小麦発酵エキスのTNF誘導活性とポリミキシンBによる阻害効果（TNF活性）

サンプル濃度 (ng/ml)	小麦発酵エ キス ポリミキシ ンB添加	小麦発酵エ キス ポリミキシ ンB無添加	低分子量リ ポ多糖 ポリミキシ ンB添加	低分子量リ ポ多糖 ポリミキシ ンB無添加	リムラス陽 性糖脂質 ポリミキシ ンB添加	リムラス陽 性糖脂質 ポリミキシ ンB無添加
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0.64	0	1.2
10	0	1.2	0	6.3	0	4.2
100	0	8.7	0	10.2	0	14.2
1000	1.7	28.3	0	6.3	0	26.2
10000	26	50.4	0	3.8	0	13.2

## 【実施例 3】

## 【0035】

化粧品

本小麦発酵エキスを使用したハンドクリームの製造方法

表9に記載した配合において脂溶性基材1の軟膏にエキスを1割前後添加して混合して軟膏を得た。

## 【0036】

【表 9】

表 9

組成	用量
白色ワセリン	250 g
ステアリルアルコール	200 g
プロピレンアルコール	120 g
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60	40 g
モノステアリン酸グリセリン	10 g
パラオキシ安息香酸メチル	1 g
パラオキシ安息香酸プロピル	1 g
精製水	適量

## 【実施例 4】

## 【0037】

## (1) 小麦発酵エキス入りクリーム処方

使用成分を表 10 に示した。A 組を 70℃ で加熱溶解し、これに 1/4 量の精製水で溶き 70℃ で加熱溶解した B 組と、1/4 量の精製水で溶き 70℃ で加熱溶解した C 組を加え、ホモジナイザーで充分混合した後 40℃ まで冷却し、D 組を加えて pH を 6.8 まで調整した後、残りの精製水と小麦発酵エキスを適量加え、充分混合して乳液を得る。尚小麦発酵エキスは、5 mg/ml になるように予め精製水に溶解しておき、乳液 100 g に対しては、その 0.1 ml を添加する。

## 【0038】

【表 10】

表 10

成分	w/w%	組
スクワラン	5.0	A
オリーブ油	10.0	A
ホホバ油	5.0	A
ステアリン酸	4.0	A
モノステアリン酸ポリオキシエチレンソルビタン (20E.O.)	1.8	A
メチルポリシロキサン	0.3	A
モノステアリン酸ソルビタン	0.5	B
自己乳化型モノステアリン酸グリセリン	3.0	B
パラオキシ安息香酸プロピル	0.2	B
パラオキシ安息香酸メチル	0.2	B
1,3-ブチレングリコール	5.0	B
濃グリセリン	6.0	B
カルボキシビニルポリマー	0.22	C
水酸化カリウム	適量	D
小麦発酵エキス (5mg/ml)	0.1	
精製水	適量	
全量	100.00	

## 【0039】

## (2) 小麦発酵エキス入りクリームの効果

本クリームを男女10人に使用してもらいアンケート調査を行った。その結果、保湿効果について良いと答えた者が10名、悪いと答えた者が0名であった（一標本符号検定： $P < 0.002$ ）。肌のかさつきの防止効果について良いと答えた者が8名、悪いと答えた者が1名で、1名は対象外であった。（一標本符号検定： $P < 0.04$ ）。使用後の肌の症状の悪化について、ないと答えた者が10名、あると答えた者が0名であった（一標本符号検定： $P < 0.002$ ）。また、軽度のアトピー様症状を持つ10名に本クリームを使用してもらいアンケート調査を行ったところ、アトピー性皮膚炎の改善について、やや良いと答えた者が7名、どちらともいえないと答えた者が3名であった（一標本符号検定： $P < 0.02$ ）。その他には、にきび跡の治りが早いという者が1名いた。また、本クリームを9名の男性に髭剃り後に使用してもらいアンケート調査を行ったところ、8名が髭剃り後の痛みの軽減、かさつきの防止、かみそり傷の早期治癒などに効果があったと答えた（一標本符号検定： $P < 0.01$ ）。さらに五十肩の症状のある2名が肩に塗って痛み軽減効果を試したところ、1名は効果ありと答えた。

## 【0040】

さらにこのクリームを火傷患者に用いた。両手皮膚を同程度に火傷した患者に、片手に小麦発酵エキスを含むクリームを、もう片方の手に小麦発酵エキスを含まないクリームを塗り経過を見たところ、小麦発酵エキスを含むクリームを外用した手の方が明らかに早く回復した。この例を含み10名の火傷患者に外用したところ、いずれも小麦発酵エキスを含むクリームを外用した箇所は小麦発酵エキスを含まないクリームを外用した箇所よりも創傷が早く回復した（フィッシャーの直接確率： $P < 0.0001$ ）。以上のことから本小



麦発酵エキスは火傷に対する治療効果を有することが示された。

### 【実施例 5】

【0041】

アメ

(1) 小麦発酵エキス入りアメ製造方法

1. 原材料としてグラニュー糖、水飴、水に小麦発酵エキスを加えたものを 5 : 5 : 5 : 1 の割合で混合し、加熱して 120℃～160℃で煮詰める。
2. 1で得たものを冷却用鉄板上で冷却し、棒状に引き伸ばして 1 g 前後の粒状に成型し飴を得た。

(2) 小麦発酵エキス入りアメの特徴

本アメ適量を水 20 ml に入れ、加熱することで溶解させた。この溶液中の小麦発酵エキス有効成分としてリポ多糖量を測定したところ、 $4.6 \mu\text{g/g}$ であった。このアメを、風邪をひいてのどの痛みのある男女 6 名に摂取させた。その後、直ちにのどの痛みに対するアンケート調査を行った。のどの痛みについては、6 名とも痛みが軽減したと感じた（一標本符号検定： $P < 0.03$ ）。

### 【実施例 6】

【0042】

小麦発酵エキス入り「飲んでお息」

アルコール分解機能増強食品・飲料

現在、アルコール分解機能増強食品として、市販されている製品に小麦発酵エキスを混合し、新たな効果として咽喉痛の緩和が認められるか否かを検討した。

市販製品：商標 飲んでお息

成分を表 11 に示した。

【0043】

【表 11】

表 11

成分	成分含有率
粉糖	78.98%
ビタミン C	10.00%
トヨリデナー P	5.00%
ビタミン B2	0.02%
香料（メントール）	0.50%
あまちゃずる（サポニン）	3.50%
T-フレーバーコンク 13189B（フラボノイド）	2.00%

【0044】

現在の「飲んでお息」には、あまちゃずるエキス及び緑茶エキスが含まれているが、植物エキスの有効成分のひとつであるリポ多糖量はわずかに 1 包あたり  $0.002 \mu\text{g}$  程度である。従ってリポ多糖含有量が多い小麦発酵エキスを適正量添加することにより、新たな機能を獲得することが期待される。小麦発酵エキスの有効成分のひとつであるリポ多糖を 1 包 2 g 当たり  $1 \sim 30 \mu\text{g}$ （小麦発酵エキスとして  $5 \sim 150 \mu\text{g}$ ）配合するのが望ましいので、先ず 1 包に  $50 \mu\text{g}$  の小麦発酵エキスが配合された製品を製造した。飲んでお息の製造工程において 100 g の製品当たり、小麦発酵エキス 2.5 mg を加えた。その結果、製品 2 g あたり、 $50 \mu\text{g}$  の小麦発酵エキスを含む新しい製品が製造された。

【0045】

飲酒しながらカラオケに興じ咽喉痛を訴える成人男女 20 名を対象にして、これまでの「飲んでお息」と小麦発酵エキスを含んだ「飲んでお息」を 10 名ずつに服用させ、公知

の効果であるアルコール分解能強化効果、及び咽喉痛緩和効果について検討した。その後、直ちに咽喉痛緩和効果に対するアンケート調査を行った。その結果、「小麦発酵エキス入り飲んでお息」には咽喉痛の軽減が10名中8名認められ、対象の「飲んでお息」の10名中2名の効果と比較して統計的に有意な差（フィッシャーの直接確率： $P < 0.012$ ）が認められた。

#### 【実施例 7】

##### 【0046】

小麦発酵エキス入り入浴剤

生体機能の改善を目的として小麦発酵エキスを加えた入浴剤を作製した。入浴剤の基本成分を表12に示した。

##### 【0047】

##### 【表12】

表12

成分	含有量
硫酸ナトリウム	25.0 g
ケイ酸カルシウム	0.26 g
香料（ゆず）	0.5 g

##### 【0048】

小麦発酵エキス入り入浴剤としては110  $\mu\text{g}$ を上記成分に添加して作製した。102人の被験者にブラインドでエキス入りとエキスの入っていない対照を渡し、通常の浴槽（160～200リットル）に入浴時に用いてアンケート（(1)体の温まり具合、(2)湯冷めのしにくさ、(3)疲労回復効果、(4)寝付き易さ、(5)肩こりの取れ具合、(6)筋肉痛に対する効果、(7)神経痛に対する効果、(8)腰痛に対する効果、(9)冷え性に対する効果、(10)水虫の改善効果、(11)肌のかさつき改善効果、(12)アトピー性皮膚炎への効果）を行った。その結果、対照に比べて7%以上の改善が見られたのは、(1)体の温まり具合（10%）、(2)湯冷めのしにくさ（7.9%）、(6)筋肉痛に対する効果（13%）、(8)腰痛に対する効果（16%）、(9)冷え性（10%）、(11)肌のかさつき改善効果（7.3%）に対する効果であった（Mantel-Haenszel検定： $P < 0.04$ ）。以上の結果から、小麦発酵エキスを入浴剤として用いることで、痛みに対する緩和効果と、体の温まりぐあいを改善することが認められた。

#### 【実施例 8】

##### 【0049】

アトピー性皮膚炎に対する治療効果

顔面、手足、体躯、首、腕、背部等に皮疹が観察され、自覚症状が中等度から高度症状を示す難治性のアトピー性皮膚炎患者男女9人（25歳から34歳）に小麦発酵エキス50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む50%グリセロール溶液を患者に一日2～3回、一回当たり2～3mlを服用させた。自覚症状（掻痒感）は患者の訴えにより、軽度、中等度、高度に分類した。2週間から2ヶ月使用後に再度受診し、効果を評価した。結果は著効（皮疹の著明改善と自覚症状の殆どの消失）が4名（44%）、有効（皮疹の軽度改善と自覚症状の減少）が4名（44%）、不変が1名（11%）で、悪化が0名であった（一標本符号検定： $P < 0.03$ ）。以上から有効率89%と判定された。

#### 【実施例 9】

##### 【0050】

ブリ野外試験による小麦発酵エキス入り飼料の感染防除効果

1. 小麦発酵エキス入り飼料の感染防御効果を野外試験で一群につき約5200尾のブリを飼育した。
2. 結果を表13に示した。連鎖球菌による死亡は非投与対照で4.8%に達した。
3. 小麦発酵エキスを100  $\mu$ g/kg/日（体重1kg、1日あたり）を摂取させた群（試験区）と、非投与群（対照区）では、小麦発酵エキス投与群が有意に（ $P < 0.0001$ ）死亡率を低下させることが認められた。

【0051】

【表13】

表13 小麦発酵エキス入り飼料の野外試験におけるブリ感染防除効果

処理	飼育数	斃死数	斃死率	有意差検定 ( $\chi^2$ 検定)
対照区	5201	249	4.79	(P<0.00001)
試験区	5193	101	1.94	

【実施例10】

【0052】

プロイラー飼育における小麦発酵エキス入り飼料の大規模試験による斃死抑制効果

1. 小麦発酵エキスを430  $\mu$ g/kg含有する飼料を作製した。
2. 供与鶏はプロイラーコマーシャル鶏を一群約5500～6000羽で用いた。対照試験区分は小麦発酵エキスを含まない飼料である。
3. 孵化後3週齢で小麦発酵エキス入りエサの投与を開始し7週齢まで毎日投与した。
4. 死亡匹数を毎日測定した。出荷時に基準に満たない鶏は廃棄した。
5. 結果を表14に示す。試験区（小麦発酵エキス入り飼料）は除去率は1.9%と少なく、対照区では3.3%に達した。育成率は試験区で98.1%となり、対照区で96.7%となったので、1.4%の育成率の向上が見られた。出荷実羽数と除去羽数を試験区と対照区で有意差検定をしたところ  $\chi^2$  検定で  $P < 0.0001$  の有意差が見られた。上のことから小麦発酵エキス入り飼料のプロイラー飼育における感染防除効果が示された。

【0053】

【表14】

表14 小麦発酵エキス入り飼料のプロイラー飼育効果

	試験区	対照区
雛羽数	5906	5525
出荷実羽数	5792	5345
除去羽数	114	180
除去率	1.9%	3.3%
育成率	98.1%	96.7%

【実施例11】

【0054】

おから発酵エキスの製造

1. 2リットルの三角フラスコに1.0リットルの水と、リン酸第一カリウム0.2g、リン酸第二ナトリウム1.15g、食塩8g、塩化カリウム0.2gを加えた。
2. 1に乾燥おから20gを加えた。
3. 2をオートクレーブで滅菌した。
4. 種菌の調製。前もって同じ組成で調製した2%おから培地5mlに小麦粉より単離しておいたパントエア・アグロメランスのコロニーを一つ加え37℃で一晩（15時間）緩やかに攪拌し、発酵させて、おから発酵用の種菌を準備した。
5. 3に4を全量加え37℃で緩やかに攪拌しながら、48時間発酵させた。

6. 5のおから発酵溶液をオートクレーブで120℃20分間の加熱抽出をした。これを遠心分離（クボタ 8800、2000rpm、10分間）し、上澄みを回収し、おから発酵エキスとした。

7. 乾燥重量の測定 0.3mlを予め秤量した1.5mlプラスチックチューブに移し、凍結後、凍結乾燥機にて、凍結乾燥を行ったところ5.97mgで衡量となった。したがって、6のおから発酵エキスの乾燥重量は溶液1ml当たり19.9mg、全量1000ml当たり、19.9gであった。

8. ブラッドフォード法によるタンパク質定量BSAを標準タンパク質として、10倍希釈したサンプルでタンパク質量を測定した。結果を表15に示した。

9. 核酸含有量の測定 100倍希釈したサンプルの210～340nmの吸光度測定を行った。260nmの吸光度から320nmの吸光度を引いた値と、DNAとしての吸光度10Dあたり、50μgとしての最大含有量を算出した。

10. 糖含量の測定 フェノール硫酸法によりグルコースを標準糖として測定した。

11. リムラスアッセイによるリムラス活性物質含有量の測定 リムラス活性物質量は生化学工業のトキシカラーシステムを用い、標準リムラス活性物質として、生化学工業Et-1を用いた。8-11の結果を表15に示した

【0055】

【表15】

表15 おから発酵エキス中の成分含量

成分	(mg/g)
タンパク質	112
糖	537
核酸	検出できず
リムラス活性物質	10

## 【書類名】 要約書

## 【要約】

【課題】 安全、かつ、安価に高濃度に免疫賦活物質を含む植物発酵エキスを製造する方法を提供すること。

【解決手段】 小麦やリンゴ等の植物に共生しているグラム陰性菌であるパントエア・アグロメランスを用いて小麦粉等の植物成分を発酵させる。植物の持つ免疫賦活作用を著しく増強することが可能になる。さらに、これらには動物成分由来の不純物の混入の問題がないので安全性が高い。

特願 2 0 0 4 - 1 3 9 7 6 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 3 9 0 0 2 5 2 1 0 ]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 1 1 月 2 0 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都世田谷区東玉川 1 - 1 0 - 2 1
氏 名	柚 源一郎

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**